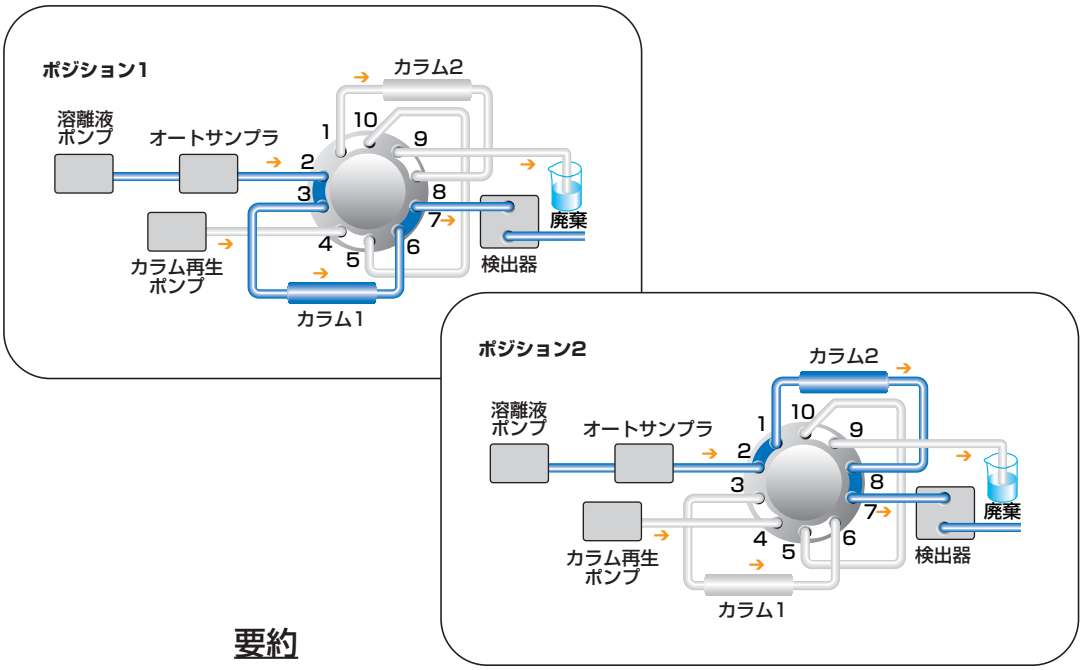
ハイスループット HPLC – Agilent 1100シリーズのバルブソリューションによるカラム再生

アプリケーション

Udo Huber



要約

製薬業界では、サンプルスループットの高い分析や精製を行うことが非常に重要である。コンビナトリアルケミストリなどによって合成されるサンプルの数が爆発的に増大する中、HPLC というプロセスが医薬品探索や開発のボトルネックになってはならない。

クロマトグラフィーのメソッドおよび分析に用いるハードウェア[4,5] を最適化することによって、 HPLC システムのスループットは向上する。本アプリケーションノートでは、Agilent 1100 シリーズのバルブソリューションの応用例として、システムに 2 本の同じカラムを取り付け、交互に切り換えて使用することにより、どのようにサンプルのスループットが向上するかを検証する。

Agilent Technologies

はじめに

通常、HPLC は次の 4 つの手順で行われる。
1. サンプルの吸引と注入
2. クロマトグラフ分析（通常はグラジェント分析）
3. カラム洗浄
4. カラム平衡化

多くの分析では、これら 4 つの手順が順番に繰り返される。しかし、1 つのシステムに全く同じ 2 本のカラムを取り付け、ポンプの数を 1 つ増やせば、手順 4、または手順 3 と手順 4 の両方を行いながら、次の分析を開始できるようになる。このような手法はカラムの交互再生と呼ばれる。カラムの交互再生では、2 つのカラムが 2 ポジション／10 ポートバルブを介して溶離液ポンプとカラム再生ポンプの間で切り替えられる。 次の分析を開始しながらカラム洗浄のみを実行するのか、あるいはカラム洗浄とカラム平衡化の両方を実行するのかは、平衡化に使用するポンプのタイプによって異なる。カラム再生ポンプとしてアイソクラティックポンプを用いる場合には、カラム平衡化のみが実行できる。一方、グラジェントポンプを用いる場合には、カラム洗浄およびカラム平衡化の両方が実行できる。カラム洗浄およびカラム平衡化は実験時間の半分近くを占めることも多く、カラムの交互再生は貴重な時間を大幅に節約できる。

このアプリケーションノートでは、2 台のポンプおよび 2 ポート／10 ポジションバルブを 1100 シリーズカラムコンパートメントに組み込む方法を説明する。分析法および Agilent 1100 シリーズのシステムを最適化する方法については、別の参考文献 1 ～ 5 を参照のこと。

使用機器

すべての実験には、以下のモジュールを含む Agilent 1100 シリーズシステムを使用した。
- Agilent 1100 シリーズ デガッサ付きクォータナリポンプ
- Agilent 1100 シリーズ ウェルプレートオートサンプラ
- Agilent 1100 シリーズ カラムコンパートメント（2 ポジション／10 ポートバルブ付き）
- Agilent 1100 シリーズ アイソクラティックポンプまたはクォータナリポンプ（カラム再生ポンプとして）

また、システムのコントロールには Agilentケミステーションソフトウェアを使用した。(rev. A.09.03)

結果と考察

1. 4 つのステップを繰り返す場合（ポンプ 1 台使用）

従来の方法では、4 つのステップが順次繰り返し行われる。したがって、分析のサイクルタイムは、4 つのステップのそれぞれにかかる時間を単純に合計したものになる（図 1 参照）。サンプルの吸引および注入には 0.85 分かかった（最適化無し）。また、B の組成を 5～95% まで変化させるグラジェントに 5 分強かかり、次いで 95%B にてカラムを 1 分間洗浄し、最後に 5%B まで平衡化するのに 3 分間を要した。これらを合計して、分析 1 回あたりのサイクルタイムは 9.85 分となる。ポンプの時間設定は以下のとおり。

ポンプ

グラジェント：	0 分で 5%B 5 分で 95%B	グラジェント
	6 分で 95%B	カラム洗浄
停止時間：	6 分	
待機時間：	3 分	カラム平衡化

この分析サイクルを連続 6 回行って得たクロマトグラムを図 2 に示す。

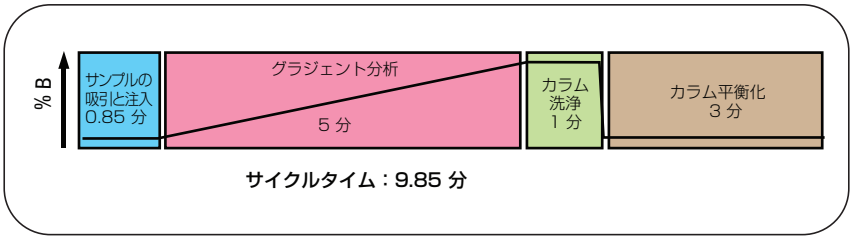


図 1
通常の分析のタイムチャート

カラム	ZORBAX SB-C18 4.6 × 50 mm、5 μm
移動相：	A= 水、B= アセトニトリル
流量：	1.5 mL/min
注入：	5 μL
カラム温度：	40 ° C
UV検出器：	DAD: 220/10 nm （ref. 360/100 nm）、標準フローセル（流路長さ10-mm）

クロマトグラフ分析の再現性を測定するため、最後の 5 回の分析について、保持時間およびピーク面積の精度の相対標準偏差を求めた。その結果、保持時間の精度は 0.03～0.13%、ピーク面積の精度は 0.17～0.48% であった。

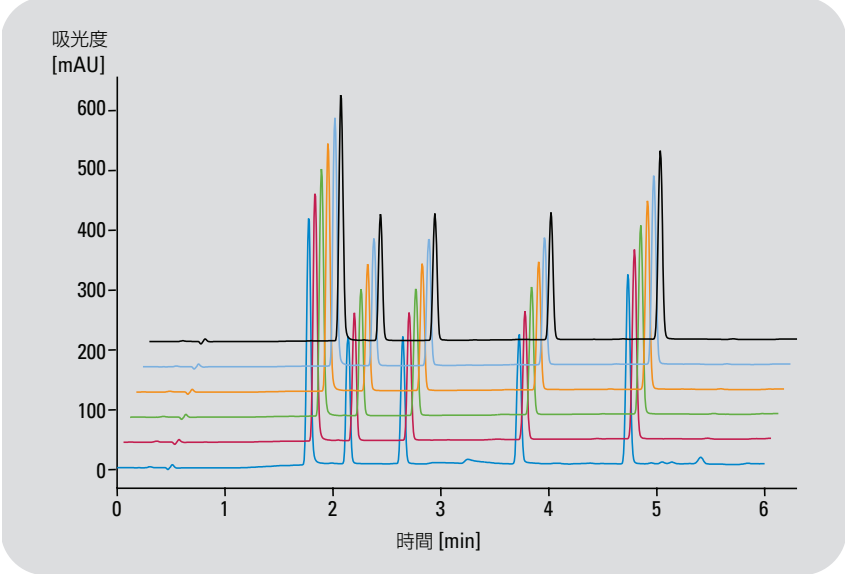


図 2
6 回連続で分析したクロマトグラム

2. カラム再生にアイソクラティックポンプを使用したカラム交互再生

カラム交互再生を行うために、溶離剤ポンプとカラム再生ポンプ、および 2 本のカラムを、カラムコンパートメント内の 2 ポジション／10 ポートバルブに接続した（1頁の図を参照）。分析の終了ごとに、カラムコンパートメント内のバルブを、[Column Thermostat Method] ウィンドウ内の [Next Position] コマンド（図 3 参照）を使用して、次のポジションに切り替えた。

図 3
[Column Thermostat Method] ウィンドウ

このコマンドを用いると、分析が終了してもバルブはしばらくそのままのポジションに留まる。次の分析を開始する直前にバルブは次のポジションに切り替わる。カラム再生にアイソクラティックポンプを使用しているため、次の分析を実行している間に、カラム平衡化のみが実施される（図 4）。サイクルタイムは 9.85 分から 7.65 分に短縮され、分析時間は 20%短縮された。ポンプの時間設定は以下の通り。

溶離液ポンプ

グラジェント：0 分で 5%B
5 分で 95%B　} グラジェント
6 分で 95%B　カラム洗浄
6.01 分で 5%B
6.8 分で 5 %B　} V1 洗浄
ストップタイム：6.8 分
ポストタイム：オフ

カラム再生ポンプ

アイソクラティック：5%B　カラム平衡化
ストップタイム：無制限
ポストタイム：オフ

図4 に示すようにグラジェント分析とカラム洗浄の後で、さらなる洗浄時間が追加されている。この時間は、溶離液ポンプから切替バルブのポート 2 まで （1 頁の図参照） の空間（V1） を分析開始時点と同じ組成の移動相で洗浄するのに使われる。この洗浄を実施しない場合は、V1 に残っている分析終了時点と同じ組成の移動相が、バルブを切り替えたとき平衡化したカラムに導入される。分析終了時点の移動相組成は95% B であるが、カラムは5% B で平衡化されているため、クロマトグラフィーでは予期しない結果を得ることになる（図5 参照）。

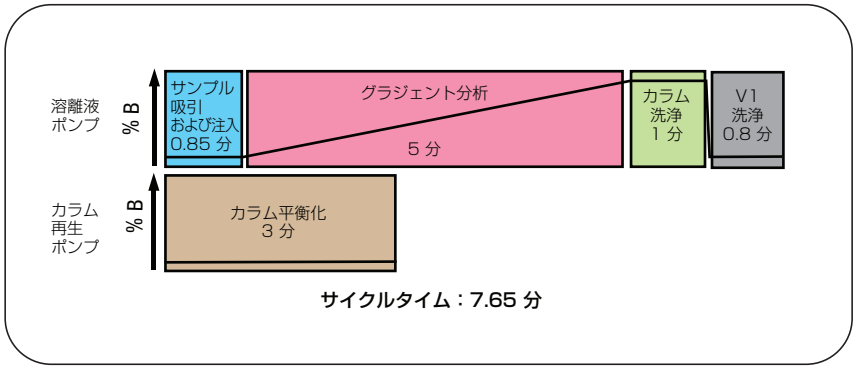


図 4
カラム再生にアイソクラティックポンプを使用した分析のタイムチャート

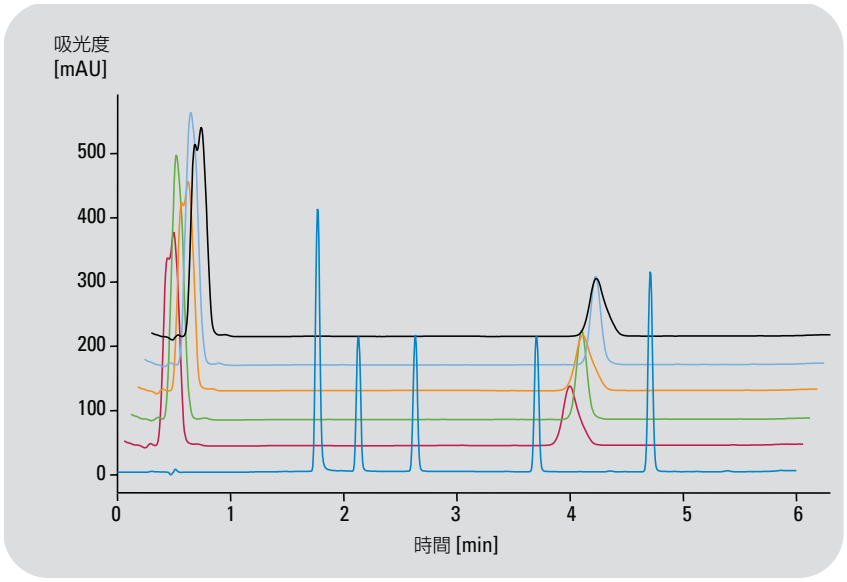


図 5
V1 洗浄をしないでカラムを切り替えた場合の結果 (6 回の連続した分析)

カラム洗浄の終了後に 5%B で V1 を洗浄することにより、平衡化されたカラムに導入されるのはスタート時の組成を持つ移動相だけになる。V1 洗浄に必要な時間は、V1 の体積および使用する流量によって左右される。一般的な分析システムであれば、V1 の洗浄には 1ml の移動相があれば十分である。分析結果のクロマトグラムを図 6 に示す。

3. カラム再生にグラジエントポンプを使用したカラム交互再生

グラジェントポンプをカラム再生に用いる場合、次の分析を開始した後でカラム平衡化だけでなくカラム洗浄まで同時に行うことができる。この方法では図 7 に示すように、アイソクラティックポンプをカラム再生に用いた場合よりさらに多くの時間の節約が可能になる。またサイクルタイムには、V1 洗浄に必要な時間がグラジェント分析終了後に加算される。最終的なサイクルタイムは、7.65 分から 6.65 分に短縮し、通常の分析と比較して 30% の時間が節約できた。ポンプの時間設定は以下の通り。

溶離液ポンプ

グラジェント： 0 分で 5%B
5 分で 95%B } グラジェント
5.01 分で 5%B
5.8 分で 5%B } V1 洗浄
ストップタイム： 5.8 分
ポストタイム： オフ

カラム再生ポンプ

グラジェント： 0 分で 5%B
0.1 分で 95%B } カラム洗浄
1.1 分で 95%B
1.2 分で 5%B カラム平衡化
ストップタイム： 無制限
ポストタイム： オフ

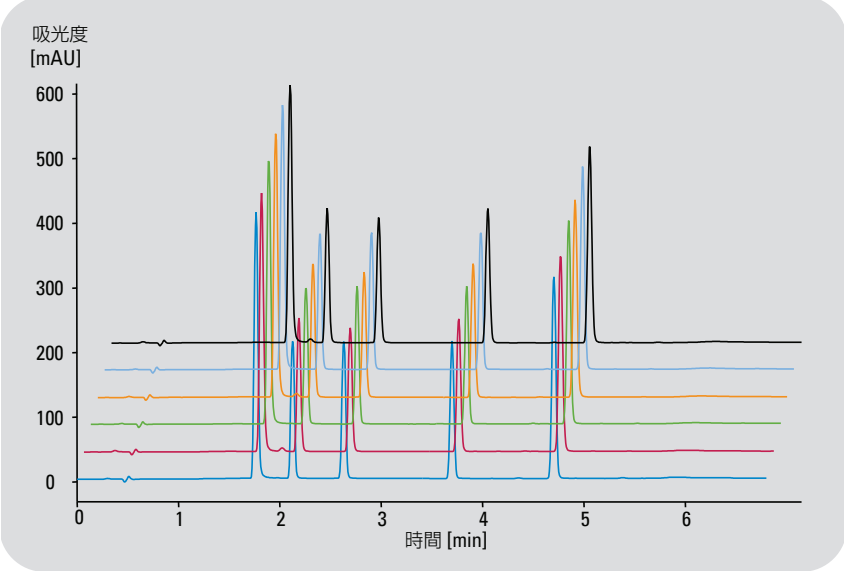


図 6
V1 洗浄を伴うカラム交互再生での 6 回連続分析結果

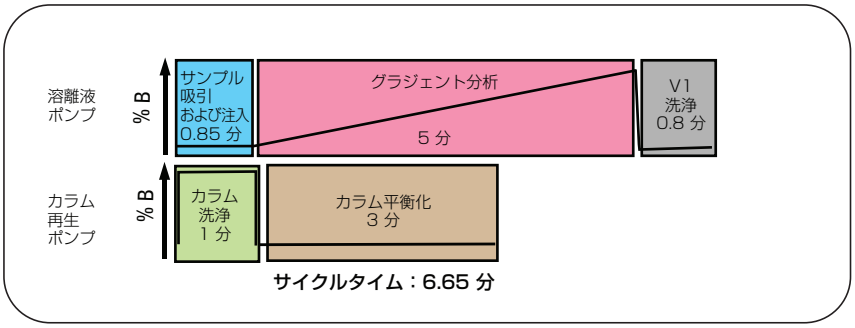


図 7
カラム再生にグラジェントポンプを使用した分析のタイムチャート

図 8 に 6 回連続で分析を行った結果得られたクロマトグラムを示す。ここでも、カラムスイッチングを行わない分析と同程度の保持時間およびピーク面積の精度が得られた。

4. グラジェントポンプとオーバーラップインジェクションを使用したカラム交互再生

Agilent 1100 シリーズのオートサンプラを用いれば、オーバーラップインジェクションを自動実行することが可能になる。これにより、分析している間に次のサンプルをサンプルループに吸引し、分析が終了するまでループ内にサンプルを保持しておくことができる。次の分析の開始時には、オートサンプラの注入バルブを切り替えるだけで、保持されていたサンプルが即座に注入される。これによりさらに時間を節約することができる。なぜなら、吸引と注入に要する時間がサイクルタイムに追加されるのは最初の分析だけで、それ以降の分析ではこの時間が含まれなくなるためだ。オーバーラップインジェクションを併用した場合、1回目を除いた 2 回目以降の分析のサイクルタイムは 5.8 分にまで縮まり、通常の分析と比較して 40% の時間が節約できたことになる。

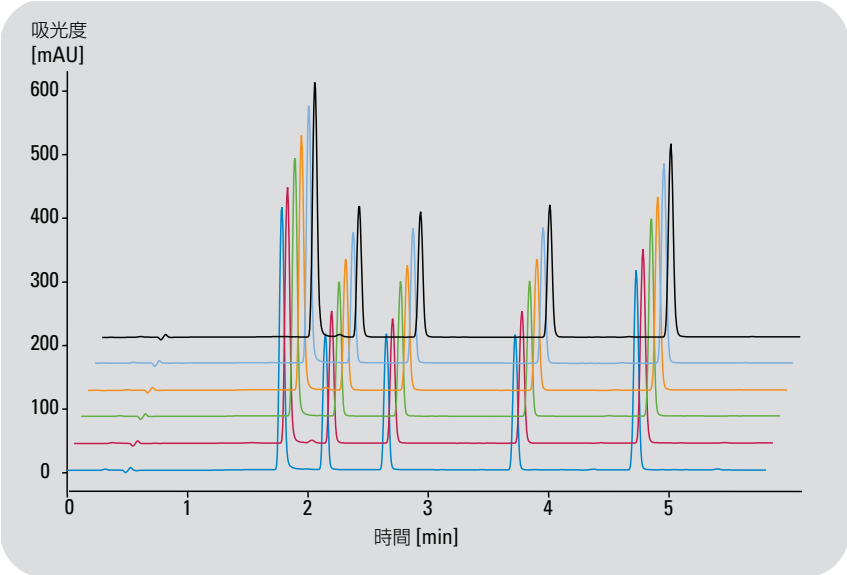


図 8
6 回連続で分析を行った結果

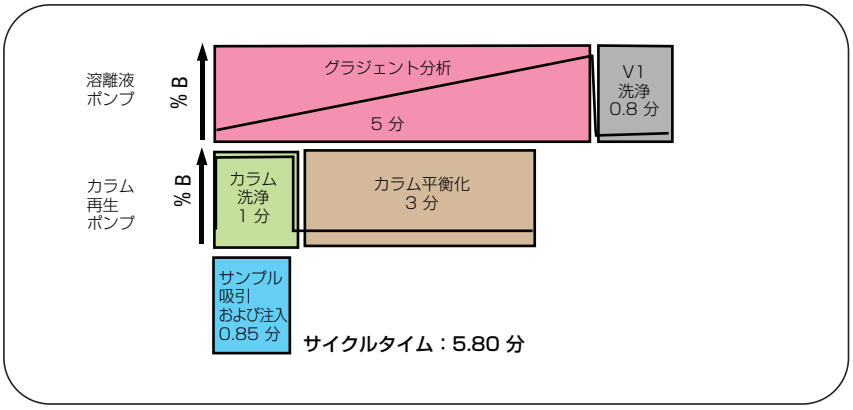


図 9
グラジェントポンプとオーバーラップインジェクションを使用したカラム交互再生のタイムチャート

ポンプおよびオートサンプラの時間設定は以下の通り。

溶離液ポンプ

グラジェント： 0 分で 5%B
5 分で 95%B } グラジェント
5.01 分で 5%B
5.8 分で 5%B } V1 洗浄
ストップタイム： 5.8 分
ポストタイム： off

カラム再生ポンプ

グラジェント： 0分で 5%B
0.1 分で 95%B
1.1 分で 95%B } カラム洗浄
1.2 分で 5%B カラム平衡化
ストップタイム： 無制限
ポストタイム： オフ

図 10 に 6 回連続で分析を行った結果得られたクロマトグラムを示す。ここでも、カラムスイッチングを行わない分析と同程度の保持時間およびピーク面積の精度が得られた。

5. 分析前および分析後のカラムのメンテナンス

通常のクロマトグラフィーでは、1 回目の分析前にカラムを平衡化することが必要となる。また、最後の分析後には適切な溶媒で一晩あるいは週末一杯をかけてカラムを洗浄する必要もあり、これを行わずにカラムを保存することはできない。分析前のカラムのメンテナンスとしては、実際のサンプルを注入する前にブランク分析を 1 度、2 度行えば良いのが普通である。このようなブランク分析をシーケンスの一部として 1 回目の分析の前に組み込んでおけば、ブランク分析が終ると自動的に 1 回目の分析が開始される。分析後のカラムのメンテナンスとして何が必要になるかは、用いる移動相によって異なる。カラムを移動相に浸けて保存できる場合、シーケンスの最後にブランク分析を 1、2 度加えれば十分である。サンプル分析に用いた移動相がバッファーなどを含む場合、カラムは最後の分析後にバッファーを含まない溶媒で洗浄した後、さらにバッファーを含まない溶媒内で保存する必要がある。溶媒切換バルブの付いたクォータナリポンプまたはバイナリポンプを溶離液ポンプとして用いる場合、クォータナリポンプの溶媒 C または D、バイナリポンプの別の溶媒セットを使ってシーケンスの最後にブランク分析を実行させることにより、カラムのアフターケアを自動実行できる。

まとめ

このアプリケーションノートでは、自動化したカラムの交互再生によって、サンプルのスループットを向上させる方法を説明した。実験は、Agilent 1100 シリーズシステムのカラムコンパートメント内に組み込まれた2 ポジション／10 ポートバルブに、同一の 2 本のカラムを取り付けた。カラム再生ポンプに、アイソクラティックポンプとグラジェントポンプのどちらを使用するかにより、次の分析をしている間にカラム平衡化だけを行うか、またはカラム洗浄とカラム平衡化の両方を実行できるのかが決まる。さらに、オーバーラップインジェクションによって分析中に次のサンプルを吸引しておけば、サンプルスループットをさらに向上できることが確認できた。

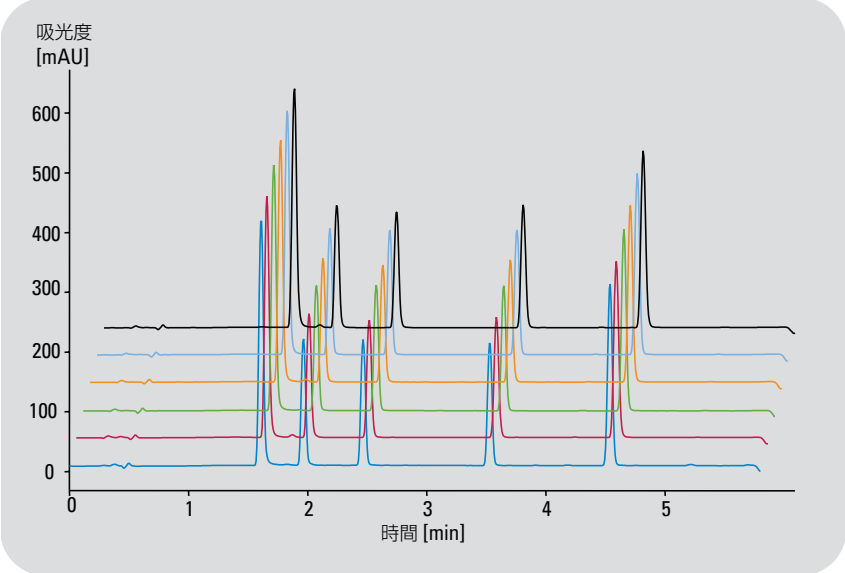


図 10
6 回連続で分析を行った結果

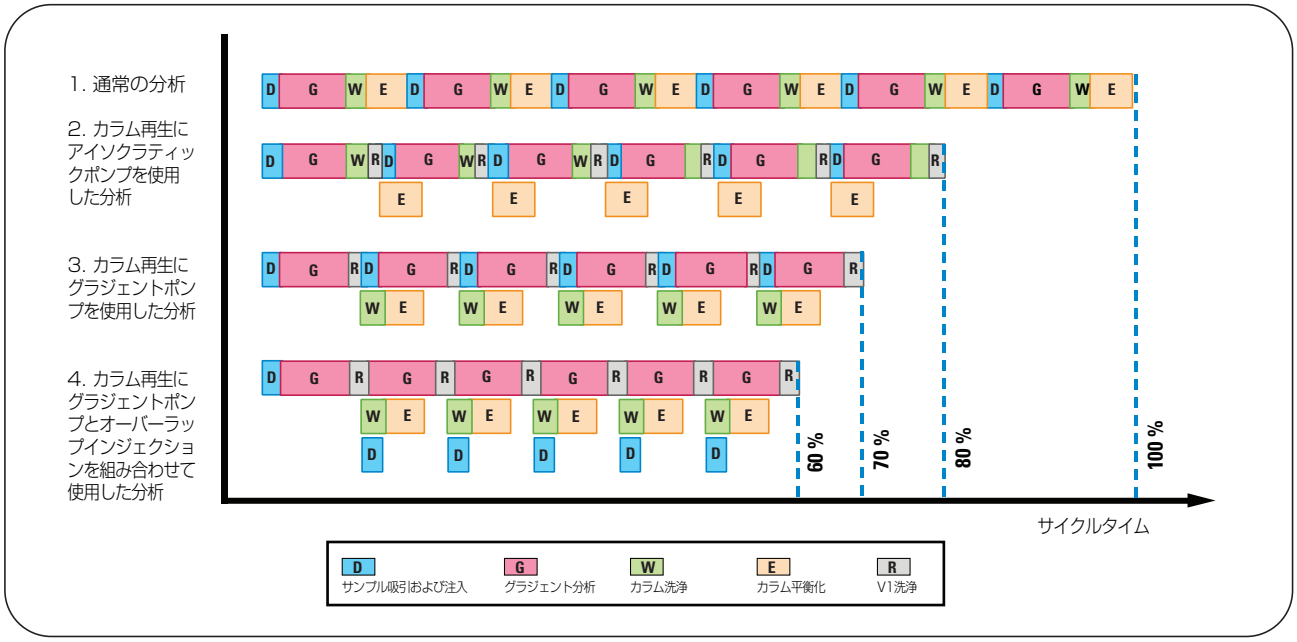


図 11
異なるメソッドごとに節約できる分析時間の比較

異なるメソッドごとに節約できる分析時間の比較を図 11 に示す。ここで示した時間は、このアプリケーションノートで用いた方法のみに適用される。その他の方法については、グラジェント分析、カラム洗浄およびカラム平衡化にかかる時間によって節約できる時間は異なる。しかし、Agilent 1100 シリーズのバルブソリューションによるカラム交互再生で、あらゆるハイスループット HPLC 法のサンプルスループットを向上できると言える。

References

1. “Optimizing the Agilent 1100 Series System for High Sample Throughput”, *Agilent Technologies Technical Note*, **1998**, publication number 5968-0467E.

2. “Optimizing the Agilent 1100 Series System for Higher Sample Throughput on Columns with Internal Diameters of 1 and 2 mm”, *Agilent Technologies Technical Note*, **1998**, publication number 5968-3166E.

3. “Strategies for fast and low carry over LC/MS analysis of drugs on the Agilent 1100 Series LC/MS system”, *Agilent Technologies Application Note*, **2001**, publication number 5988-5026E

4. “Optimizing the Agilent 1100 Series well-plate sampler”, *Agilent Technologies Application Note*, **2000**, publication number 5988-1432EN.

5. “Configuring and setting up the Agilent 1100 Series well-plate sampler for optimum performance”, *Agilent Technologies Technical Note*, **2000**, publication number 5988-1596EN.

6. “New dimensions for HPLC applications”, *Agilent Technologies Brochure*, **2002**, publication number 5988-6707EN.

Udo Huber はAgilent Technologies（Waldbronn , Germany）のアプリケーションケミストです。

本書の内容は Agilent 1100シリーズの性能を保証するものではありません。

www.agilent.co.jp/chem/yan

Copyright © 2002 Agilent Technologies
All Rights Reserved.
本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan、Oct.21, 2002
5988-7831JAJP

横河アナリティカルシステムズ株式会社　本社/〒192-0033 東京都八王子市高倉町9-1

●カストマコンタクトセンター　0120-477-111
1） システム、製品および部品に関するご相談窓口
2） 製品の操作、アプリケーションの問合せおよび故障時の連絡窓口